



DEUTSCHES
PATENTAMT

21 Aktenzeichen: P 36 26 953.0
22 Anmeldetag: 8. 8. 86
43 Offenlegungstag: 5. 3. 87

FP 12



DE 3626953 A1

51 // C07K 3/26

30 Unionspriorität: 32 33 31
03.09.85 DD WP B 01 D/280 270 8

71 Anmelder:
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DDR
4020 Halle, DD

74 Vertreter:
Nindel, H., Dr.rer.nat., DDR 4020 Halle

72 Erfinder:

Schneider, Jochen, Dr.rer.nat.; Krauß,
Gerd-Joachim, Dr.rer.nat.; Danew, Petko, Dr.med.,
DDR 4020 Halle, DD

54 Verfahren und Apparat zur elektrokinetischen Ultrafiltration von Makromolekülen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Apparat zur Fraktionierung von Gemischen aus elektrisch geladenen Makromolekülen verschiedener Größe aus flüssigen Gemischen, die z. B. die Proteinfractionierung- und -anreicherung aus biologischen Flüssigkeiten gestattet. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Fraktionierung elektrisch geladener Moleküle mit Hilfe einer Kombination von Freier Elektrophorese und Ultrafiltration zu erreichen, wobei die Anzahl der Fraktionen und die Größe der Moleküle zu einer jeweils angepaßten Konfiguration der Apparat führen sollen. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß eine Kolonne thermostatierter Kammern durch Ultrafiltrationsmembranen voneinander getrennt, von einem elektrischen Gleichstrom durchflossen wird, wodurch sich die Membranen mit den Fraktionen belegen. Durch Umkehr der Polarität des elektrischen Feldes werden die Moleküle von den Membranen abgelöst und können dann aus den Kammern problemlos isoliert werden.

Mögliche Einsatzgebiete der Erfindung sind die Vorfraktionierung von Enzymaktivitäten, die Gewinnung großer Proteinmengen für biotechnologische Zwecke, die Gewinnung von Enzymen als Therapeutika und andere.

DE 3626953 A1

Patentansprüche

1. Verfahren zur elektrokinetischen Ultrafiltration von Makromolekülen durch Kombination von Freier Elektrophorese und Ultrafiltration gekennzeichnet dadurch, daß ein Molekülgemisch beim Durchgang durch ein System von Ultrafiltrationsmembranen gestaffelter Porengröße in Fraktionen getrennt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß für die Durchführung der Fraktionierung eine Primär-Kammer (a) mit dem Molekülgemisch und die Kammern (B) und (C) mit Pufferlösung gefüllt werden.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2 gekennzeichnet dadurch, daß alle Kammern in Parallelbetrieb an einen Thermostaten angeschlossen werden.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 gekennzeichnet dadurch, daß nach Füllung der Kammern an die Elektroden 4 eine elektrische Gleichspannung angelegt wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 4 gekennzeichnet durch, daß nach Eintreten der Strom- bzw. Spannungsättigung vor der Entleerung der Kammer B, die an den Elektroden 4 anliegende Gleichspannung kurzzeitig umgepolt wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 5 gekennzeichnet dadurch, daß die Entleerung der Kammern in Abhängigkeit von der Einstellung eines spezifischen Potentialverlaufs innerhalb einzelner Kammern steuerbar ist.
7. Apparat zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß eine variable Anzahl von thermostatisierbaren Kammern (ABC) durch Ultrafiltrationsmembranen (1) voneinander getrennt hintereinander vertikal oder horizontal eine Kolonne bildend, angeordnet sind und mit einer elektrischen Gleichspannungsquelle in Verbindung stehen.
8. Apparat nach Anspruch 7 gekennzeichnet dadurch, daß jede Kammer (A, B, C) doppelwandig ist und je einen Zu- und Abfluß für Kühlfähigkeit und für den eigentlichen Kammerinhalt besitzt.
9. Apparat nach Anspruch 7 gekennzeichnet dadurch, daß die Kammern (B) und (C) mit Membranen (1) geeigneter Porengröße mit Hilfe geeigneter Kupplungsmechanismen ausgerüstet sind.
10. Apparat nach Anspruch 7 gekennzeichnet dadurch, daß die Kammern (A) und (C) mit je einer Elektrode (4) geeigneter geometrischer Gestalt für das Anlegen einer möglichst homogenen Gleichspannung ausgerüstet sind.
11. Apparat nach den Ansprüchen 7 bis 9 gekennzeichnet dadurch, daß die Kammern (B) je eine in radialer Richtung durch die Kammerwände geführte Meßelektrode (5) besitzen.
12. Apparat nach den Ansprüchen 7 bis 11 gekennzeichnet dadurch, daß die Kolonne durch geeignete Verbindung der für die jeweils benötigte Anzahl von Einzelkammern (B) aufgebaut ist.
13. Apparat nach den Ansprüchen 7 bis 12 gekennzeichnet dadurch, daß die Kammern (B) und (C) mit Membranen (1) ausgerüstet sind, die in der Kolonne nach abnehmender Porengröße angeordnet sind.
14. Apparat nach den Ansprüchen 7 bis 13 ge-

kennzeichnet dadurch, daß die Kammer (C) zur kontinuierlichen Spülung mit Pufferlösung mit einem externen Vorratsgefäß in Verbindung steht.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Apparatur zur elektrokinetischen Ultrafiltration von Makromolekülen und erlaubt die Fraktionierung von Makromolekülgemischen durch eine Kombination von Freier Elektrophorese und Ultrafiltration.

Aus der Entwicklung der Biotechnologie und modernen Forschung ergibt sich in zunehmendem Maße der Bedarf an Apparaten zur leistungsfähigen Isolierung biologisch aktiver Proteine für folgende Einsatzgebiete:

- Vorfractionierung zur weiteren Hochreinigung und Charakterisierung von Enzymaktivitäten (biochem. Grundlagenforschung)

- Gewinnung großer Proteinmengen für biotechnologische Zwecke:

- Enzyme für die Trägerfixierung
- Ectoenzyme aus mikrobiellen Kulturen zum Abbau von Zellstrukturen (Zellwandabbau-Protoplastisierung, Proteinbereitstellung)

- Enzyme aus Zellhomogenaten (z. B. pflanzliche Zellkulturen) für die Biotransformation organischer Stoffe zu Arzneimitteln

- Enzyme für die Feinchemikalienbereitstellung (z. B. aus Recombanten)

- Ausgewählte biotechnologische Einsatzgebiete: Stärkeverarbeitung, Bauindustrie, Textilindustrie (Amylasen), Waschmittel, Käseprodukte, Lederindustrie (Proteasen), Frucht- und Gemüsesaftproduktion (Pektinasen, Amylasen), Backwarenherstellung (Amylasen, Proteasen) u. a.

- Fleischaufbereitung
- Gewinnung von Enzymen als Therapeutika, z. B. Applikation zur verbesserten Arzneimittelresorption; Kompensation der Insuffizienz bestimmter Organfunktionen; Behandlung von Erkrankungen

- Vorreinigung von Proteinen für immunologische Untersuchungen (z. B. in der Differentialdiagnostik)

- Abtrennung von Proteinen aus biotechnologischen "Abwässern", z. B. aus der Antibiotika-Produktion; Papierherstellung u. a.

- Der Apparat ist grundsätzlich auch zur Fraktionierung anderer Makromoleküle, wie Muco-Polysaccharide und Nukleinsäuren geeignet.

Es sind verschiedene Verfahren der elektrophoretischen Trennung von Polyelektrolyten bekannt. Dabei wird die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine genutzt, die von der Größe der Molekülladung sowie von der Größe und Form der einzelnen Teilchen abhängt. Darüber hinaus beeinflussen auch die Eigenschaften des Trägermediums die Wanderungsgeschwindigkeit.

Bei der Freien Elektrophorese bewegen sich kolloidal gelöste Teilchen in der Untersuchungslösung unter elektrischer Feldwirkung. Dementsprechend sind die jeweils verwendeten Geräte sowie der Ablauf der elektrokinetischen Vorgänge voneinander verschieden. Typische Beispiele sind Patente zur Ablenkungselektrophorese (US-PS 40 61 560, DE-PS 15 98 109, 16 98 181).

Für die Ultrafiltration von Makromolekülen stehen verschiedene kommerziell angebotene Geräte zur Verfügung, die die Abtrennung von Biopolymeren unter Druck über Filtermembranen erlauben.

Effektive Möglichkeiten zur Entsalzung von Proteinen

schaft die Elektrodialyse, wobei Ionenaustauschermembranen, teilweise in Kombination mit elektroneutralen Ultrafiltrationsmembranen, verwendet werden, deren Widerstände die Wirtschaftlichkeit der Kammern bestimmen. Die bekannten technischen Lösungen erlauben lediglich eine Grobfractionierung von großen (Proteinen) und kleinen (anorgan. Ionen) elektrischen Ladungsträgern.

In dem US-PS 28 01 962 und 30 70 318 wird eine Proteinanreicherung durch dialytisch parallel geschaltete Kammern erreicht, wobei die angelegte Gleichspannung lediglich die Trennung beschleunigt. Der Grad der Konzentration ist kontinuierlich schwer verfolgbar. Es ist sehr zweifelhaft, ob die Apparatur einen kontinuierlichen Langzeitbetrieb erlaubt. Die verwendeten Papierfilter bzw. Dialysemembranen verstopfen sehr schnell. In den Patenten werden keine Reinigungsmöglichkeiten beschrieben. Die Apparaturen erlauben keine Auftrennung von Molekülen unterschiedlicher Größe.

In der US-PS 38 44 926 wird ein Elektrodialysator mit rotierender Außenkammer und zahlreichen Kammern um die Mittelachse des zylindrischen Gerätes beschrieben, der Enzymmixturen entsalzt.

Neuere technische Lösungen ordnen mehrere Trennkammern mit Dialysemembranen an, wobei das elektrische Feld senkrecht zum Flüssigkeitsstrom angelegt wird (US-PS 40 43 895; 41 23 342; 42 76 140; EP 00 29 540).

Die technische Lösung im Patent JP 59 26 105 beinhaltet in einem Gleichspannungsfeld ein System aus aufeinanderfolgenden Kammer, die durch vergleichsweise dicke Gelmembranen voneinander getrennt sind. Eine Fraktionierung nach Molekülgröße ist nicht möglich. Die Gelmembranen zeigen hohe Adsorption für die zu trennenden Moleküle und damit ist mit hohem Verlust des Trenngutes zu rechnen. Durch aufwendige laufende Spülung der Einzelkammern muß in den Einzelkammern ein für das ampholytische Verhalten der Moleküle diffiziles Ionenmilieu geschaffen werden. Die Pufferträge enthalten Lösungen unterschiedlicher pH-Werte.

In der DE-PS 33 37 669 (Biotrap) wird ein Elektrokonzentratoren beschrieben, der in vorhandene Elektrophoreseapparaturen eingesetzt werden muß. Das Makromolekülgemisch wird bei Passage durch nur ein Membran nicht fraktioniert. Das in DE-PS 33 37 668 beschriebene Verfahren beschreibt lediglich eine Eluierung von Gemischen aus Gelen, nicht aber eine Fraktionierung.

Ziel der Erfindung ist es, eine Apparatur zu realisieren, die die Fraktionierung elektrisch geladener Makromoleküle aus flüssigen Gemischen, z. B. die Proteinfractionierung und -anreicherung aus biologischen Flüssigkeiten, gestattet.

Der Ablauf der Fraktionierung soll diskontinuierlich beliebig oft wiederholbar und automatisierungsfähig sein, so daß sowohl analytische wie biotechnologische Aufgaben erfüllt werden können.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Fraktionierung elektrisch geladener Makromoleküle mit Hilfe einer Kombination von Freier Elektrophorese und Ultrafiltration zu erreichen, wobei die Anzahl der Fraktionen und die Größe der Moleküle zu einer jeweils angepaßten Konfiguration der Apparatur führen sollen.

Weiterhin sollen durch geeigneten Aufbau der Apparatur und die Wahl des Regimes der äußeren Parameter eine oftmalige Wiederholung des Fraktionierungsprozesses möglich und darüber hinaus nur ein minimaler Anteil von Verschleißteilen Bestandteil der Apparatur

sein.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß eine Kolonne von thermostatisierten Kammern gebildet wird, deren jede durch eine auswechselbare Ultrafiltrationsmembran einseitig abgeschlossen ist. Die Ausrüstung der aneinanderzureihenden Kammern erfolgt in Anpassung an die jeweils zu fraktionierenden Moleküle mit Membranen entsprechend gestaffelter Porengröße. Je nach Aufgabenstellung (z. B. Aufkonzentrieren) werden Kammern gleicher und/oder unterschiedlicher Volumina eingesetzt. Am Anfang und am Ende der Kolonne befinden sich je eine Kammer mit einer Elektrode zur Erzeugung eines elektrischen Feldes über die gesamte Länge der Kolonne.

Jede der Kammern besitzt einen separaten Zu- und Abfluß und eine separate Thermostatisierung, so daß die Kolonne aus einer variablen Anzahl von Kammern nach dem Baukastenprinzip zusammengesetzt werden kann.

In Funktion werden die einzelnen Kammern im Parallelbetrieb an einen Thermostaten angeschlossen, alle Kammern außer der ersten werden mit Pufferlösung gefüllt und die erste Kammer wird mit dem zu fraktionierenden Gemisch beschickt. Nachdem die Kolonne auf diese Weise betriebsbereit ist, wird an die Elektroden der ersten und letzten Kammer eine elektrische Gleichspannung so angelegt, daß die Makromoleküle des Gemischs in Richtung Kolonne zu wandern beginnen. Beim Durchlaufen der Kolonne treffen die Moleküle auf das nach abnehmender Porengröße gestaffelte System der Ultrafiltrationsmembranen und belegen diese als Fraktion in der Reihenfolge abnehmender Molekülgrößen.

Die Folgekammern nach der Primärkammer können durch kontinuierliche Beschickung der Primärkammer bis auf ein optimales Maß mit Fraktionen gefüllt werden, dabei tritt die aus der Drucktechnik bekannte Konzentrationspolarisation nicht auf.

Wenn im zu fraktionierenden Gemisch Salzionen enthalten sind, wandern diese je nach Polarität im Sinne der Elektrodialyse in die Endkammer und können dort gegebenenfalls kontinuierlich oder zyklisch ausgespült werden. Weiterhin entstehen in der Primärkammer und in der Endkammer Elektrolysegase, für deren Abtransport bei der konstruktiven Lösung gesorgt werden muß (im Ausführungsbeispiel nicht dargestellt).

Wenn die Fraktionierung vollständig stattgefunden hat, was am Erreichen eines Sättigungswertes der Elektrodenspannung bei Konstanzstrombetrieb bzw. des Elektrodensstromes bei Konstanzleistungsbetrieb oder an der Einstellung eines spezifischen Potentialverlaufs innerhalb einzelner Kammern erkennbar ist, werden die Kammern entleert, wobei auch durch Umpolung des elektrischen Feldes die fraktionierten Moleküle von den Membranen abgelöst werden können.

Danach kann der geschilderte Vorgang von vorn beginnen. Gegebenenfalls läßt sich der gesamte periodische Ablauf automatisieren.

Für die kontrollierende Messung ist jede einzelne Kammer mit einer Meßelektrode ausgerüstet.

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Fig. 1 zeigt die Kolonne für die fraktionierende elektrokinetische Ultrafiltration schematisch. Die einzelnen Kammern sind durch Ultrafiltrationsmembranen 1 gestaffelter Porengröße getrennt. Jede der Kammern stellt ein zylindrisches Doppelmalegefäß dar. Zwischen äußerer Wandung 2 und innerer Wandung 3 befindet sich

das Volumen mit Zu- und Abflußstutzen für den Durchlauf der Thermostat-Flüssigkeit, wobei alle Kammern parallel geschaltet sind.

Alle Kammern besitzen weiterhin einen Zu- und Abflußstutzen zum Innenraum, wobei der Kammer *A* mit dem zu fraktionierenden Primär-Gemisch, die Kammern *B* und *C* mit Pufferlösung gefüllt werden. Nach Beendigung der Fraktionierung verlassen die Kammer *A* ein sekundäres, d. h. das um die Fraktion reduzierte Primärgemisch, die Kammern *B* die Fraktionen $1, 2 \dots n$ und die Kammer *C* ein Rest-Gemisch von Puffer und Molekülen, die alle Membranen durchlaufen haben. Die Kammern *A* und *C* sind mit internen Elektroden 4 geeigneter geometrischer Gestalt für das Anlegen eines möglichst homogenen elektrischen Feldes an die Kolonne ausgerüstet. Die Kammern *B* besitzen je eine Elektrode 5 für die Messung des elektrischen Kammerpotentials.

Fig. 2 zeigt die Kammern *A*, *B* und *C* im Schnitt. Die Verbindung der Kammern untereinander geschieht durch Schraubengewinde und zwischengelegte Dicht-
ringe 6. Die Ultrafiltrationsmembranen 1 werden durch Schraubenringe 7 auf die Dichtfläche des Kammerober-
teils 8 gepreßt und sind somit leicht auswechselbar.

25

30

35

40

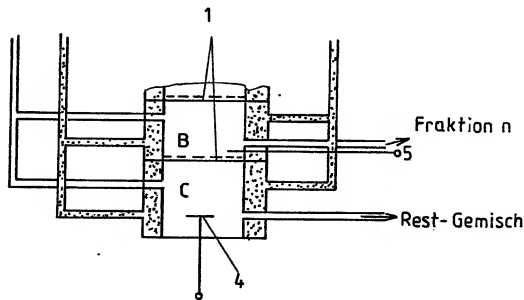
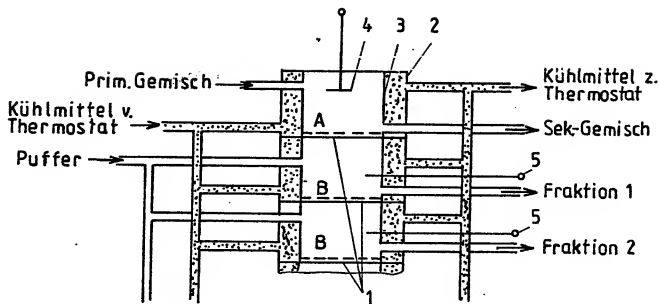
45

50

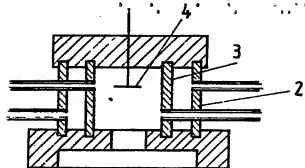
55

60

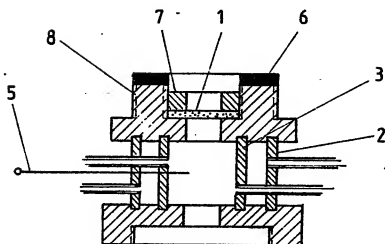
65



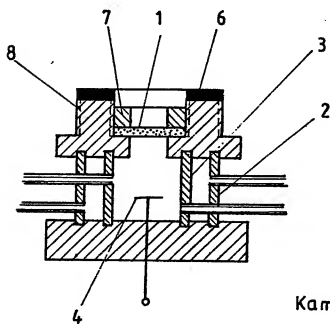
Figur 1



Kammer A



Kammer B



Kammer C

Figur 2